

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭57-13357

⑬ Int. Cl.<sup>3</sup>  
G 01 N 33/50  
33/72

識別記号

庁内整理番号  
6422-2G  
6422-2G

⑭ 公開 昭和57年(1982)1月23日

発明の数 4  
審査請求 有

(全 11 頁)

⑮ 過酸化活性物質を測定するための組成物、試験具及び試験方法、並びに該試験具の製造方法

⑯ 特 願 昭56-74330

⑰ 出 願 昭56(1981)5月19日

優先権主張 ⑱ 1980年6月2日 ⑲ 米国(US)  
⑳ 155318

㉑ 発 明 者 アラン・エルマー・パークハート  
アメリカ合衆国インディアナ4651  
4エルクハート・ストーニー・

クリーク・ドライブ51818  
㉒ 発 明 者 アン・マリー・タイドマン  
アメリカ合衆国ミシガン49112  
エドワーズバーグ・モートン・  
ドライブ68570

㉓ 出 願 人 マイルス・ラボラトリーズ・インコーポレーテッド  
アメリカ合衆国インディアナ4651  
5エルクハート・ミルトル・ストリート1127  
ピー・オー・ボックス40

㉔ 代 理 人 弁理士 津国肇

明 細 書

1. 発明の名称

過酸化活性物質を測定するための組成物、試験具及び試験方法、並びに該試験具の製造方法

2. 特許請求の範囲

1. 有機ヒドロペルオキシド及び、過酸化物質及び過酸化活性物質の存在下で検知可能な応答を示し得る指示薬から成る、試験試料中に存在する過酸化活性物質を検知するための組成物であつて、該組成物中に Co(II) 錯体を存在せしめて、該組成物がアスコルビン酸塩の悪影響に対し抵抗性を示すようにしたことを特徴とする組成物。

2. 該有機ヒドロペルオキシドが、 $\alpha$ -ブチルヒドロペルオキシド、クメンヒドロペルオキシド、ジイソプロピルベンゼンヒドロペルオキシド、2,5-ジメチルヘキサノ-2,5-ジヒドロペルオキシド、パラメンタンヒドロペルオキシド又はこれらの混合物である特許請求の範囲第1項記載の組成物。

求の範囲第1項記載の組成物。

3. 該指示薬が、ベンジジン、 $\alpha$ -トリジン、3,3',5,5'-テトラ(低級アルキル)-ベンジジン、2,7-ジアミノフルオレン又はこれらの混合物から成る特許請求の範囲第1項又は第2項記載の組成物。

4. 該有機ヒドロペルオキシドがクメンヒドロペルオキシドで、該指示薬が3,3',5,5'-テトラ(低級アルキル)ベンジジンである特許請求の範囲第1項又は第2項記載の組成物。

5. 該錯体が  $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_2$  である特許請求の範囲第1項又は第2項記載の組成物。

6. 該錯体がコバルト(II)ヘキサアンミントリクロリドである特許請求の範囲第3項記載の組成物。

7. 該錯体がコバルト(II)ヘキサアンミントリクロリドである特許請求の範囲第4項記載の組成物。

8. 試験試料中に存在する過酸化活性物質を検知するための組成物において、有機ヒドロペ

ルオキシド、過酸化物質及び過酸化活性物質の存在下で検知可能な応答を示し得る指示薬、及びCo(Ⅲ)錯体からなる組成物を担体中に包含せしめてなる、アスコルビン酸塩の悪影響に対し抵抗性を示す、試験試料中に存在する過酸化活性物質を測定するための試験具。

9. 該有機ヒドロペルオキシドが、*m*-ブチルヒドロペルオキシド、クメンヒドロペルオキシド、ジイソプロピルベンゼンヒドロペルオキシド、2,5-ジメチルヘキサノ-2,5-ジヒドロペルオキシド、パラメンタンヒドロペルオキシド又はこれらの混合物である特許請求の範囲第8項記載の試験具。
10. 該指示薬がベンジジン、ロートリジン、3,3',5,5'-テトラ(低級アルキル)-ベンジジン、2,7-ジアミノフルオレン又はこれらの混合物である特許請求の範囲第8項又は第9項記載の試験具。
11. 該有機ヒドロペルオキシドがクメンヒドロペルオキシドで、該指示薬が3,3',5,5'-テ

するための方法。

16. 該有機ヒドロペルオキシドが、*m*-ブチルヒドロペルオキシド、クメンヒドロペルオキシド、ジイソプロピルベンゼンヒドロペルオキシド、2,5-ジメチルヘキサノ-2,5-ジヒドロペルオキシド、パラメンタンヒドロペルオキシド又はこれらの混合物である特許請求の範囲第15項記載の方法。
17. 該指示薬がベンジジン、ロートリジン、3,3',5,5'-テトラ(低級アルキル)-ベンジジン、2,7-ジアミノフルオレン又はこれらの混合物である特許請求の範囲第15項又は第16項記載の方法。
18. 該有機ヒドロペルオキシドがクメンヒドロペルオキシドで、該指示薬が3,3',5,5'-テトラ(低級アルキル)ベンジジンである特許請求の範囲第15項又は第16項記載の方法。
19. 該錯体がCo(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>である特許請求の範囲第15項又は第16項記載の方法。
20. 該錯体がコバルト(Ⅲ)ヘキサアンミントリク

トラ(低級アルキル)ベンジジンである特許請求の範囲第8項又は第9項記載の試験具。

12. 該錯体がCo(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>である特許請求の範囲第8項又は第9項記載の試験具。
13. 該錯体がコバルト(Ⅲ)ヘキサアンミントリクロリドである特許請求の範囲第10項記載の試験具。
14. 該錯体がコバルト(Ⅲ)ヘキサアンミントリクロリドである特許請求の範囲第11項記載の試験具。
15. 試験試料中に存在する過酸化活性物質を検知するための組成物において有機ヒドロペルオキシド、過酸化物質及び過酸化活性物質の存在下で検知可能な応答を示し得る指示薬、及びCo(Ⅲ)錯体から成る組成物を担体中に包含せしめて成る、アスコルビン酸塩の悪影響に対し抵抗性を示す試験具と、試料を接触させ、つづいて、試験具における検知可能な応答を観察する一連の過程から成ることを特徴とする試験試料中に存在する過酸化活性物質を測定

ロリドである特許請求の範囲第17項記載の方法。

21. 該錯体がコバルト(Ⅲ)ヘキサアンミントリクロリドである特許請求の範囲第18項記載の方法。
22. 試料中に存在するアスコルビン酸塩の妨害作用に対し抵抗する、該試験試料中に存在する過酸化活性物質を測定するための試験具の製造方法であつて、  
Co(Ⅲ)を水に溶解した第1溶液を調製し、  
該第1溶液で担体を湿潤せしめて該担体に該第1溶液を包含せしめ、  
該湿潤担体を乾燥してCo(Ⅲ)錯体を残置せしめ、  
有機ヒドロペルオキシド及び過酸化物質と過酸化活性物質の存在下で検知可能な応答を示し得る指示薬を水又は他の適当な溶媒に溶解した第2溶液を調製し、  
該第2溶液で担体を湿潤せしめて該乾燥担体に該第2溶液を包含せしめ、ついで、  
該担体を乾燥してCo(Ⅲ)錯体、有機過酸化物質及

び指示薬物質を一緒に残置せしめることを特徴とする製造方法。

23. 該有機過酸化物が、ヒューチルヒドロペルオキシド、クメンヒドロペルオキシド、ジイソプロピルヒドロペルオキシド、2,5-ジメチルヘキサノージヒドロペルオキシド、パラメントンヒドロペルオキシド及びこれらの混合物である特許請求の範囲第22項記載の製造方法。
24. 該指示薬がベンジジン、オートリジン、3,3',5,5'-テトラ(低級アルキル)ベンジジン、2,7-ジアミノフルオレン又はこれらの混合物である特許請求の範囲第22項又は第23項記載の製造方法。
25. 該Co(II)錯体が $\text{Co}(\text{NH}_3)_4\text{C}_2\text{O}_4$ である特許請求の範囲第22項又は第23項記載の製造方法。
26. 該Co(II)錯体が $\text{Co}(\text{NH}_3)_4\text{C}_2\text{O}_4$ である特許請求の範囲第24項記載の製造方法。
27. 該指示薬が3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンで、該Co(II)が $\text{Co}(\text{NH}_3)_4\text{C}_2\text{O}_4$ である特許

のことによつて色変化のような検出可能な応答を示すという点で酵素類似物である。このことから、試験試料中の溶血の存在を測定する種とんどの方法は、この擬似ペルオキシダーゼ活性に依拠している。

色を形成する指示薬の過酸化物による酸化反応に対する酵素様触媒作用に依拠するいくつかの方法が、多年に亘り発達してきた。基本的には、これらの方法は従来式の化学的方法及び試薬を担持した“浸漬-脱取り”型の試験片を包含している。前者のうちの典型的な例は、リチャード・エム・ヘンリー(Richard M. Henry)等の化学的な化学の基礎及び手法(ハガースタウン, メリーランド:ハーバー・アンド・ロー, 1974)[Chemical Chemistry Principles and Techniques (Hagerstown, Maryland: Harper and Row, 1974)] 1124~1125頁の中に述べられている。この方法は、水酢酸(緩衝剤)、ジフェニルアミン(指示薬)及び過酸化水素を使用している。このような従来式方法は、分析可能

請求の範囲第22項記載の製造方法。

### 3. 発明の詳細な説明

本発明は、試験試料中の過酸化活性物質の測定に関する。更に詳細にいうと、例えば試料中にも存在しているかもしれないアスコルビン酸からのあり得るであろう感影響に対し抵抗するような測定のための組成物に関する。

多くの分析方法が、尿、糞懸濁物及び胃腸内の含有物のような試料中の過酸化活性物質の存在を検出するために、現在、利用されている。ヘモグロビンとその誘導体は、それらが酵素ペルオキシダーゼと同じ様に挙動するので、そのような“過酸化活性”物質の典型である。このような物質は、擬似ペルオキシダーゼ(ブソイドペルオキシダーゼ)類とも言われてきた。過酸化活性物質は、過酸化物及びベンジジン、オートリジン、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン、2,7-ジアミノフルオレンのような指示薬化合物又は同様な指示薬物質間での酸化還元(レドックス)反応に触媒作用を及ぼし、そ

性を立証してきたが、にもかかわらず、それらは明白な欠点を伴うものである。それらの欠点の多くは試薬が安定性に乏しくまた感度が不十分であるということである。

過酸化活性物質の測定のための第2の方法で、殆んど臨床検査技師及び分析者によつて現在好まれている方法は、いわゆる“浸漬-脱取り”試験片を用いるものである。典型的なそのような試験具は、ザ・エームス・デイヴィジョン・オブ・マイルス・ラボラトリーズ・インコーポレーテッド(the Ames Division of Miles Laboratories, Inc.)で製造され、ヘマスティックス(HEMASTIX®)の名で販売されている試験片である。これらは、本質的には、プラスチック片又は把手に固定された多孔質の紙片から構成される。この担体(matrix)には、有機ヒドロペルオキシド及びオートリジンの緩衝化された混合物が含まれている。ヘモグロビン、ミオグロビン、赤血球又は他の擬似ペルオキシダーゼを含む液体中に浸漬すると、担体には青

色が発色し、その強度は試料中の過酸化活性物質の濃度に比例する。このようにして、担体に発色した色を標準色と比較することによつて、検査技師は、試料中に存在する分析対象物の量を、半定量的に測定することができる。

試薬片が湿式の化学的方法に優る利点は、主として2点ある。すなわち、試薬片は試薬類の調製又は付属装置を必要としないので使用が簡単であり、さらに、試薬類のより大きな安定性が与えられるので、その結果、改善された精度、感度及び経済性をもたらす。

しかし、過酸化活性種の分析がいずれの方法で行なわれようとも、両者に固有の問題が存在し、それに対しては、今日まで、満足のいく解決法が見出されていない。すなわち、その問題点は、試験試料中のアスコルビン酸塩又は他の還元剤の存在に基づく妨害である。例えば、尿分析の場合、最近食物が、しばしば、ビタミンC(アスコルビン酸)を高濃度(単位)含んでいるという事実は、そのような食物(食事)を

摂取した患者は、必ずと言つてよい程、尿中アスコルビン酸塩の濃度を不規則に高めるため、潜血のごとき尿中成分の分析において重大な問題を引き起している。

アスコルビン酸塩のような還元剤の悪影響は、早くも1938年に知られていた。アール・コーン(R. Kohn)とアール・エム・ワトラウス(R. M. Watrous), ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(Journal of Biological Chemistry), 124, 163~168(1938)参照。同じ問題が依然としてこの分野の分析を悩ませているということが、尿中の潜血(擬似ペルオキシダーゼ)の分析を行なう場合、正確な潜血の測定を行なうためには、同時にアスコルビン酸の分析を行わねばならないという1979年の提言から明らかである。エル・ニールセン(L. Nielsen), ビー・ジエイ・ヨルゲンセン(P. J. Jorgensen)とアー・シー・ハンセン(A. C. Hansen), Ugeskrift for Laeger, 141, 791~793(1979)参照。

グルコース感応性試薬のような他の試験系を用いてアスコルビン酸塩の妨害作用を排除する多くの試みが文献に報告されているけれども、今日まで、それによつて過酸化活性物質の測定がそれらの悪影響からまぬがれたという成功例は1つも報告されていない。グルコース感応系を用いる場合には、アスコルビン酸塩が試薬に到達する前にそれを識別する方法から、酵素を用いてその場でアスコルビン酸塩を分解する方法まで種々の方法がある。

すなわち、1970年6月16日、ダールクビスト(Dahlqvist)に与えられたカナダ特許第844,564号は、尿中のグルコース測定用の装置又は他の手段を開示している。それは、通常のグルコース感応性試薬類が含浸された多孔質部分に加えて、更に尿試験試料を受容する部分を含むものである。この試料受容部分は、イオン交換材を含んでおり、装置内におけるその1つの機能は、尿試料中に存在すると考えられる全てのアスコルビン酸塩を吸着することである。

アスコルビン酸塩の妨害を緩和すべき他の試みは、1979年9月18日ダニング(Danninger)等と与えられた米国特許第4,168,205号内に反映されている。この文献は、試薬配合物に酵素であるアスコルビン酸塩オキシダーゼを包含せしめることを提案しているが、その理論は、もしアスコルビン酸塩が試料中に存在すれば、それは酵素作用で酸化されて、目的とする分析に悪影響を及ぼさない化合物であるデヒドロアスコルビン酸塩になるであろうというものである。

1968年11月9日クー(Ku)に与えられた米国特許第3,411,887号は、グルコースオキシダーゼのような酵素的な酸化性物質に基づく試薬系を用いてアスコルビン酸塩の妨害作用を除去する方法を開示している。アスコルビン酸塩“捕捉系”(“trapping system”)が用いられる。これは、“イオン化した状態において、酸化還元指示薬…と〔アスコルビン酸塩〕の間の値の酸化-還元電位 $E^{\circ}_{red}$ を有するイオン化可

能な重金属化合物から構成される。コバルト、鉄、水銀及びニッケルをはじめとする多くの金属が例として挙げられている。

これらの研究に加えて、グルコース試験に関するアスコルビン酸塩の問題に対する注意は、

1. エツチ・ギフホルト(H. Gifford)等., ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (J. Amer. Med. Assoc.), 178, 149~150 (1961)
2. ビー・オゴーマン(P. O'Gorman)等., Brit. Med. J., 603~606 (1960)
3. アール・ブランド(R. Brandt)等., クリニカル・シムカ・アクタ (Clin. Chim. Acta), 51, 103~104 (1974)
4. アール・ブランド(R. Brandt)等., アメリカン・ジャーナル・クリニカル・パソロジー (Am. J. Clin. Pathol.), 68, 592~594 (1977)

で述べられている。

上記引用のクー特許と同じように、他の文献

示する。例えば、Co(II)酢酸塩は、クメン過酸化物を触媒的に分解するために商業的に用いられている。ザ・メルク・インデックス (The Merck Index), 9版, 311頁(1976)参照。一連のCo(II)錯体は、クー・ロース., (Kh. Lohs.), Monatsber. Deut. Akad. Wiss. Berlin, 8, 657~659 (1966) (ケミカルアブストラクト, 67, 120383Z, 1967年参照) 過酸化物を触媒的に分解することが報告されている。

以下に述べるように、本発明は過酸化活性物質を測定するための現状の技術体系を改善するものである。このような系は、必ず、有機ヒドロペルオキシドとオトリジン又は3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンのような酸化還元指示薬から構成される。この分析対象物は、それが酵素ペルオキシダーゼに似ているので、指示薬と有機ヒドロペルオキシド間の反応を起こして色を生じ、その強度が分析対象物の濃度の指標となる。Co(II)錯体によつて示されるペルオキシダーゼ活性に関する誤りようのない教示に

はコバルトを用いたアスコルビン酸塩の錯化及び酸化を取り扱っている。ジー・ブラクノロ(G. Bragagnolo) [Ann. Chim. Applicata, 31, 350~368, 1941] は、アスコルビン酸の溶液が金属コバルトの存在下で空気によつて酸化されることを報告した。同様な活性は、ジャーナル・オブ・ザ・ケミカル・ソサエティー・オブ・ジャパン [Journal of the Chemical Society of Japan] 52, 820~826 (1942) でトモキチ・イワサキ(Tomokichi Iwasaki)によつてCo(NH<sub>3</sub>)<sub>5</sub>Cl<sub>2</sub>に関して報告されている。

重要なことは、先行技術はグルコース分析を広く取り扱っているが、それは、ペルオキシダーゼ及び潜血(ヘモグロビン)のような過酸化活性物質の測定におけるアスコルビン酸塩の妨害問題を解消する方法について有益な示唆を与えていることである。米国特許第3,411,887号(上を参照)の開示にもかかわらず、この先行技術は疑問の余地なくCo(II)のような金属イオンが事実擬似ペルオキシダーゼであることを教

示らせば、当業者が、かかる物質が過酸化物/指示薬系と相入れるものではないと考えることは明らかであろう。もしも分析対象物を、その存在下で色変化するように意図された正にその試薬配合物に入れた場合、誤つた正の結果が得られることが期待されることは明らかであろう。これらの結論にもかかわらず、驚くべきことには、過酸化活性のCo(II)錯体類が、誤つた正の結果をもたらさないばかりか、実際には、かえつて、試薬系を改善して、信頼性あるものに、すなわち、アスコルビン酸塩の妨害作用に基因する不正確さに鋭敏でなくすることが見出された。

簡単にいえば、本発明は試験試料中の過酸化活性物質の存在を検知する組成物及び該組成物を包含する試験具に関し、その場合、該試験具は試料中に存在するアスコルビン酸の妨害作用に対して抵抗性を示す。この試験具を用いる方法も、その製造方法と同じように、ここで開示されている発明の範囲内にある。この組成物は、有機ヒドロペルオキシドと、過酸化活性物質及

び過酸化物の存在下で色の変化のような検知可能な応答を示し得る指示薬とから構成される。それは、更にCo(Ⅲ)の錯体を含む。アスコルビン酸塩に対して予測を越えた抵抗性を与える原因となると考えられるのが、まさにこの後者のものである。

試験組成物中で用いられるべく意図される有機ヒドロペルオキシドは、多くの良く知られた有機ペルオキシド類から選択することができる。しかしながら、それは指示薬の存在下で過酸化活性物質と相互作用して色の変化又は試験組成物によつて吸収若しくは反射される光の量の変化のような検知可能な応答を示すことができなければならない。好適であることが判っているヒドロペルオキシド類には、 $\alpha$ -ブチルヒドロペルオキシド、クメンヒドロペルオキシド、ジイソブチルベンゼンヒドロペルオキシド、2,5-ジメチル-ヘキサノ-2,5-ジヒドロペルオキシド、パラメンタンヒドロペルオキシド又はこれらの混合物がある。これらのうち、クメ

ンヒドロペルオキシドが最も好ましいことが判っている。

有機ヒドロペルオキシド及び過酸化活性物質の存在下で検知可能な応答を示すことができ、かつそれゆえ本発明に用いて好適な指示薬類は多数存在する。多くの場合、これらには、いわゆる“ベンジジン型”化合物が含まれる。これらのうち典型的なものは、ベンジジン、オトリジン、3,3',5,5'-テトラ(低級アルキル)ベンジジン、2,7-ジアミノフルオレン又はこれらの各種割合の混合物である。ここで、“低級アルキル”は、メチル、エチル、n-プロピル及びイソプロピル並びに各種のブチル、ペンチル及びヘキシル異性体をはじめとする、炭素数1~6を有するアルキル基である。

本発明に有用なCo(Ⅲ)錯体類には、 $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ 、 $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$ 及び $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{CO}_3]\text{NO}_3$ が含まれる。もちろん、他の多くのCo(Ⅲ)錯体類も、ここで教示される本発明に適用可能であることが理解される。 $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ がすぐれた結果を

示し、アスコルビン酸塩の妨害作用を減少せしめるための好ましい錯体であることが見出された。本発明の好ましい態様において、組成物はクメンヒドロペルオキシド、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン及び $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ から構成される。

試験具の製造は、この組成物を適当な担体に包含せしめることから成り、この後者は多様な形態をとり得る。すなわち、米国特許第3,846,247号はフェルト、多孔質のセラミックス片及び織布状又はマット状のガラス繊維の使用を教示する。更に、米国特許第3,552,928号は、木の棒、布、スポンジ材及び粘土質材料の使用を教示する。担体として合成樹脂のフリース及びガラス繊維のフェルトを使用することが、英国特許第1,369,139号に示唆されている。他の英国特許第1,349,623号は、下層にある紙の担体(マトリックス)の一種として、細い繊維からなる光透過性の網の使用を示している。ポリアミド繊維が仏国特許第2,170,397号に教

示されている。しかしながら、これらの提案例にもかかわらず、従来技術において、担体として主として用いられ、しかも、本発明によつて特に好ましい材料は、戸紙のような吸収性の紙である。かくして、担体として用いるための適切な材質の選択には多くの余地があり、またこの担体が多様な物理的形態をとり得ることが理解できる。これらすべてのタイプのものは、本発明の範囲内にあるものとして意図されている。

本発明の組成物は、各種の方法で担体に包含させることができる。各成分は、水又はクロロホルム、メチレンクロライド、メタノール、シクロヘキサン及びそれらの混合物のような他の適当な溶媒に溶解又は懸濁することができる。このような溶液又は懸濁液は、適当な担体の上に試薬類が印刷される場合のインクとして、戸紙に含浸せしめるために用いられるか、あるいは、担体を、例えば、ドクターブレードを用いて組成物で被覆することができる。

本発明で好ましい方法は、組成物の溶液又は

懸濁液を伊紙に含浸させることであり、好ましい溶媒は、蒸留水又は脱イオン水である。含浸は、一枚伊紙を溶液中に浸漬し、その浸漬された伊紙を空気乾燥器中で乾燥することによつて達成できる。この乾燥伊紙は、ついで約0.5cm四方の正方形に裁断され、次に約0.6×10cmのポリスチレン膜片の一端に取りつけられる。取りつけは、ダブル・スティック(Double Stick)として知られ、3M社(3M Co.)から入手できるような両面接着テープを用いて達成される。

本発明の試験具を調製するにあつて特に好ましい方法は、Co(Ⅱ)錯体を水性の第1浸漬液として、伊紙に導入する方法である。すなわち、伊紙をまずコバルト錯体の溶液で含浸し、乾燥し、次に、有機ペルオキシド及び指示薬の水性の第2浸漬液で再び含浸し、続いて、2回目の乾燥が行われる。他の試薬類に先立つて、伊紙にコバルト錯体が含浸される2段浸漬法は、コバルト錯体が第2の浸漬段階で含浸される方法によつて調製された試験片に比べて、アスコル

ビン酸塩に対するはるかに大きな抵抗性を有する試験具をもたらすことが見出された。

以下の例は、ここに開示された発明の概念及び利点を一層よく示すために提示される。それらは本発明品の作り方及び使用方法並びにアスコルビン酸塩に対する、本発明の改良された抵抗性を証明する比較データを提示する。しかしながら、これらの例は、決して、本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。

#### A. 試験組成物

##### 例1 $\text{Co}(\text{NH}_3)_4\text{C}_2\text{O}_4$

実験を行つて、試験試料中のペルオキシダーゼ又は過酸化活性物質の存在を測定できる本発明の組成物を調製した。すなわち、以下の成分は、表示された順序で一つに合わされた。

蒸留水	50 ml*
クエン酸ナトリウム塩	2.13 g**
クエン酸	2.77 g
トリエタノールアミンホウ酸塩	5.00 g
メチルスルホン	6.67 g

ラクリル硫酸ナトリウム塩	0.75 g
エチレンジアミンテトラ酢酸	0.13 g
ジメチルホルムアミド	50.0 ml
6-メトキシキノリン	0.4 ml
クメンヒドロペルオキシド	2.0 ml
3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン	0.60 g
$\text{Co}(\text{NH}_3)_4\text{C}_2\text{O}_4$	0.15 g

\*: ミリリットル, \*\*: グラム.

この組成物は、デシリットル当り0.135mgのヘモグロビンを含む尿試料に接触させると、青色を呈することが見出される。

##### 例2 コバルト(Ⅱ)アセチルアセトナト

$\text{Co}(\text{NH}_3)_4\text{C}_2\text{O}_4$ に替えて、コバルト(Ⅱ)アセチルアセトナトを用いた(0.20g/100ml)以外は、例1の実験を反復した。この組成物は、デシリットル当り0.135mgのヘモグロビンを含む尿試料に接触させると、青色を呈する。

##### 例3 $[\text{Co}(\text{NH}_3)_4\text{H}_2\text{O}]\text{C}_2\text{O}_4$

$\text{Co}(\text{NH}_3)_4\text{C}_2\text{O}_4$ に替えて $[\text{Co}(\text{NH}_3)_4\text{H}_2\text{O}]\text{C}_2\text{O}_4$ を用いた(0.15g/100ml)以外は、例1の実験を反

復した。この組成物は、デシリットル当り0.135mgのヘモグロビンを含む尿試料に接触させると、青色を呈する。

##### 例4 $[\text{Co}(\text{NH}_3)_4\text{CO}_3]\text{NO}_3$

$\text{Co}(\text{NH}_3)_4\text{C}_2\text{O}_4$ に替えて $[\text{Co}(\text{NH}_3)_4\text{CO}_3]\text{NO}_3$ を用いた(0.15g/100ml)以外は、例1の実験を反復した。この組成物は、デシリットル当り0.135mgのヘモグロビンを含む尿試料に接触させると、青色を呈する。

##### 例5 $[\text{Co}(\text{NH}_3)_4\text{CO}_3]\text{NO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

$\text{Co}(\text{NH}_3)_4\text{C}_2\text{O}_4$ に替えて $[\text{Co}(\text{NH}_3)_4\text{CO}_3]\text{NO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ を用いた(0.17g/100ml)以外は、例1の実験を反復した。この組成物は、デシリットル当り0.135mgのヘモグロビンを含む尿試料に接触させると、青色を呈する。

#### B. 試験具

##### 例6 $\text{Co}(\text{NH}_3)_4\text{C}_2\text{O}_4$

実験を行つて、例1の組成物を包含する伊紙組体から成る試験具を製造した。

実験室用伊紙(イートン・アンド・ダイクマ

ン No237) に 2 段階浸漬法で  $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_2$  及び例 1 の残りの成分を含浸せしめた。つまり、 $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_2$  を  $0.15\text{g}/100\text{ml}$  の濃度になるように蒸留水に溶解して第 1 浸漬液を調製した。伊紙をこの溶液に浸漬し、ついで  $95^\circ\text{C}$  の空気乾燥器の中で 12 分間乾燥した。

表示した順序で以下の成分を混合して第 2 浸漬液を調製した。

蒸 留 水	50 ml*
クエン酸ナトリウム塩	2.13 g**
クエン酸	2.77 g
トリエタノールアミンホウ酸塩	5.00 g
メチルスルホン	6.67 g
ラウリル硫酸ナトリウム塩	0.75 g
エチレンジアミンテトラ酢酸	0.13 g
ジメチルホルムアミド	50.0 ml
6-メトキシキノリン	0.4 ml
クメンヒドロペルオキシド	2.0 ml
3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン	0.60 g

\*: ミリリットル, \*\*: グラム

#### 例 8 $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$

伊紙担体に、例 3 の組成物を含浸させた、すなわち、 $\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}_2$  溶液に替えて  $0.15\text{g}/100\text{ml}$  の  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$  溶液を用いた以外は、例 6 の実験を反復した。ヘモグロビンとアスコルビン酸塩の両者を含有する尿中でのこの試験具の試験では、各種のヘモグロビン濃度に対応する容易に識別可能な色水準が得られた。

#### 例 9 $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{CO}_3]\text{NO}_2$

伊紙担体に、例 4 の組成物を含浸させた、すなわち、 $\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}_2$  溶液に替えて  $0.15\text{g}/100\text{ml}$  の  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{CO}_3]\text{NO}_2$  溶液を用いた以外は、例 6 の実験を反復した。ヘモグロビンとアスコルビン酸塩の両者を含有する尿中でのこの試験具の試験では、各種のヘモグロビン濃度に対応する容易に識別可能な色水準が得られた。

#### 例 10 $[\text{Co}(\text{NH}_3)_4\text{CO}_3]\text{NO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

伊紙担体に、例 5 の組成物を含浸させた、すなわち、 $\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}_2$  溶液に替えて  $0.17\text{g}/100\text{ml}$  の  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_4\text{CO}_3]\text{NO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  溶液を用いた以外

第 1 浸漬液の残渣を含む乾燥伊紙を第 2 浸漬液に浸漬し空気乾燥器中、 $95^\circ\text{C}$  で、12 分間乾燥した。

試験具の組立ては、含浸乾燥された  $0.6\text{cm}$  角の伊紙を  $0.6 \times 10\text{cm}$  のポリステレンフィルム片の一端に、両面接着テープ (3 M カンパニー、ダブル・ステイック 415) を用いて取りつけることによつて行なわれた。

ヘモグロビンとアスコルビン酸塩の両者を含む尿でのこの試験具の試験では、各種のヘモグロビン濃度に対応する容易に識別可能な色水準が得られた。

#### 例 7 コバルト(II)アセチルアセトナト

伊紙担体に例 2 の組成物を含浸させた、すなわち  $\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}_2$  溶液に替えて  $0.20\text{g}/100\text{ml}$  のコバルト(II)アセチルアセトナト溶液を用いたこと以外は、例 6 の実験を反復した。ヘモグロビンとアスコルビン酸塩の両者を含有する尿中でのこの試験具の試験では、各種のヘモグロビン濃度に対応する容易に識別可能な色水準が得られた。

は、例 6 の実験を反復した。ヘモグロビンとアスコルビン酸塩の両者を含有する尿中でのこの試験具の試験では、各種のヘモグロビン濃度に対応する容易に識別可能な色水準が得られた。

#### C. アスコルビン酸塩による妨害作用

##### 例 11 $\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}_2$

本発明の試験具に対するアスコルビン酸塩の影響を調べるために一連の実験を行なつた。

試験片を例 6 で記述したようにして製造した。更に、コバルト錯体を除外した、すなわち、第 2 浸漬液のみを用いて伊紙担体を含浸せしめた以外は、全く同じ方法で比較試験片を製造した。これらの試験片を、陰性尿及びそれにヒトの全血、アスコルビン酸又はその両者が予め添加された試料を含む試験試料中に浸漬して試験した。

発色を 1 分後に肉眼で観察し、ついで相対的な色強度に対応する数値を割り付けた。すなわち、比較試験片を各種の濃度のヘモグロビンを含有するがアスコルビン酸塩を含まない尿試料中に浸漬した。色数値は以下のように割り付け



た。

ヘモグロビン(mg/%) 0 0.015 0.045 0.135 0.405

色 数 値 0 10 20 30 40

かくして、ヘモグロビンを全く存在せしめない尿試料中に比較試験片を浸漬したときに発生する色を、色数値：0とした；一方、100mg当り0.405 mgのヘモグロビンを含む尿によつて発生した色を値40とした。

結果は、以下のとおりであつた。

尿試料		1分後の肉眼観察結果	
ヘモグロビン (mg/%)	アスコルビン酸 (mg/%)	対照	試験具
0	0	0	0
0.045	0	25	25
0.045	50	2	8
0.135	0	30	32
0.135	50	13	22

上記データからコバルト錯体を含む試験具は、コバルト錯体を全く有しない対照試験具にまさつて顕著に改良されていることが判る。

不変に維持される。肉眼観察では、その検出器（すなわち、観察者の眼）が人によつて異なり、また、同一人であつても日によつて異なる。

3. Rapid Scannerは、人間による観察よりも、データの一層正確な定量化を行なうことができ、そのため、結果相互間の比較が、肉眼観察によるよりも、一層客観的に行なえるようになる。

このRapid Scannerは、ザ・エームス・カンパニー・ディヴィジョン・オブ・マイルス・ラボラトリーズ・インコーポレーテッド、エルクハート、インジアナ、U. S. A. (the Ames Division of Miles Laboratories, Inc., Elkhart, Indiana, U. S. A.)によつて組立てられた。そしてそこからスペクトル及び性能特性に関する完全な情報を得ることができる。

Rapid Scannerからの三刺激値(Tri-stimulus values)は、"Supplement No 2 to Commission Internationale de L'Eclairage (Paris,

## 例12 コバルト(Ⅲ)アセチルアセトナト

例7で製造された試験具を用いて例11と同様の実験を行なつた。例11の肉眼観察法を用いるかわりに、色形成は"迅速走査器(Rapid Scanner)"として知られる装置を用いて観察された。この装置は、デジタル・エクイップメント・コーポレーション(Digital Equipment Corporation)から入手されるPDP-12コンピュータと接続(interface)される走査型反射分光光度計である。この機器は、可視領域での反射スペクトルの迅速測定に用いられる。コンピュータは、スペクトルデータの記憶と演算を行なう。迅速走査器(Rapid Scanner)での試験片の性能測定は、同一試片についての肉眼観察にまさつて、以下の利点がある：

1. 試料を取り巻く光源及び条件が変わらずに維持される。肉眼観察では、光源が、波長成分においてのみならず、観察される試片の位置によつても変動し得る。

2. Rapid Scannerを用いると、検出特性が

France) Publication No. 15, Colorimetry, (E-1.3.1), 1971."で決められている規則に従つて、色差値(ΔE)を演算するために用いられた。それゆえ、以下この装置からのデータは、ΔE又は色差単位に換算して記録される。

すなわち、例11のようにして、Co(Ⅲ)錯体を全く含まない対照試験具をCo(Ⅲ)アセチルアセトナトを含む例7の試験具と比較した。この比較は、種々のヘモグロビン濃度の尿でアスコルビン酸塩を含み、また、含まないものを用いて行なつた。

Rapid Scannerによつて得られた色差単位(ΔE)は、以下のようにヘモグロビン濃度(アスコルビン酸塩の不存在下)に対応する：

ヘモグロビン(mg/%) 0 0.015 0.030 0.045 0.135  
ΔE 0 40 50 58 63

このデータは、対照試験具、すなわち、Co(Ⅲ)アセチルアセトナトが存在しないことを除いては例12のようにして製造された試験具を用いて、Rapid Scannerから得られた。

Co(Ⅱ)アセチルアセトナトを含む試験具を0.135 mg%ヘモグロビンを含む尿試料で、アスコルビン酸を有するものと及び有しないものについて試験したとき、その結果は以下のとおりであつた：

尿 試 料		Rapid Scanner の結果 (ΔE)	
ヘモグロビン (mg/%)	アスコルビン酸 (mg/%)	対 照	試験具
0.135	0	63	57
0.135	50	18	35

このデータは、対照試験具が強いアスコルビン酸塩感受性を示したにもかかわらず、Co(Ⅱ)錯体を含む試験具ではアスコルビン酸塩の妨害が顕著に減殺されることを示している。

#### 例 13 $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$

例 8 の試験具、すなわち  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{H}_2\text{O}]\text{Cl}_2$  を含有する試験具を評価したことを除いて、例 12 の実験を反復した。結果は以下のとおりである。

くアスコルビン酸塩感受性の顕著な減少を示す。

#### 例 15 $[\text{Co}(\text{NH}_3)_4\text{CO}_3]\text{NO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

例 10 の試験具、すなわち  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_4\text{CO}_3]\text{NO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  を含有する試験具を評価したことを除いては、例 12 の実験を反復した。結果は以下のとおりである：

尿 試 料		Rapid Scanner の結果 (ΔE)	
ヘモグロビン (mg/%)	アスコルビン酸 (mg/%)	対 照	試験具
0.135	0	63	54
0.135	50	18	49

この表は、コバルト(Ⅱ)錯体の存在に基づくアスコルビン酸塩感受性の劇的な減少を明瞭にするデータを示す。

#### D. 安定性試験

##### 例 16

コバルト(Ⅱ)の過酸化活性に関して先行文献の教示があるため、例 6 のようにして製造された試験具及び対照試験具(コバルト錯体なしというものを除いては例 6 のようにして製造された

尿 試 料		Rapid Scanner の結果 (ΔE)	
ヘモグロビン (mg/%)	アスコルビン酸 (mg/%)	対 照	試験具
0.135	0	63	60
0.135	50	18	27

このデータは、コバルト(Ⅱ)錯体の存在に基づくより小さいアスコルビン酸塩感受性を反映している。

#### 例 14 $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{CO}_3]\text{NO}_3$

例 9 の試験具、すなわち  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{CO}_3]\text{NO}_3$  を含有する試験具を評価したことを除いて、例 12 の実験を反復した。結果は以下のとおりである：

尿 試 料		Rapid Scanner の結果 (ΔE)	
ヘモグロビン (mg/%)	アスコルビン酸 (mg/%)	対 照	試験具
0.135	0	63	62
0.135	50	18	43

このデータは、コバルト(Ⅱ)錯体の存在に基づく

もの)を、安定性について、試験した。Co(Ⅱ)の存在下では組成物中のクメンヒドロペルオキシドが分解されるだろうという予想にもかかわらず、この実験は、本発明と対照試験具間の安定性の相違を、実質上は、何ら示さなかつた。

例 6 のいくつかの試験具、コバルト含有のものも対照のものも、両者を空気乾燥器中 50℃で 2 週間保存して促進試験に付した。ついで、これらの促進試験に付した試験片ならびに促進試験に付さない試験片を、陰性尿及び種々の量のヒト全血を予め添加した陰性尿中に浸漬した。発色を例 6 におけるように、すなわち、1 分後肉眼で評価した。そのデータは以下のとおりである：

ヘモグロビン (mg/%)	対 照		本 発 明	
	1 分後の肉眼観察結果		1 分後の肉眼観察結果	
	促進試験なし	2週間50℃	促進試験なし	2週間50℃
0.000	0	0	0	0
0.015	20	19	20	18
0.030	22	21	21	21
0.045	25	25	25	23
0.135	30	32	32	30
0.405	40	40	40	40

上のデータから理解できるように、過酸化水素とCo(Ⅱ)が、50℃で2週間の保存後でさえ、両立しないということが全くないことが明らかである。更に、コバルト含有の試験具は、コバルト(Ⅱ)の存在しない対照試験具と同等の感度を有する。